Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 4, Oct.-Nov. 2023, p. 477-489

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۲ ص. ۴۸۹-۴۷۷



Research Article
Homepage: https://ifstrj.um.ac.ir



Investigation of Chemical Properties of Green Tea Ethanolic Extract and Its Inhibitory and Lethal Effects on *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* (Causing Rot in Strawberry and Grapes)

M. Rahmati-Joneidabad[1]*, B. Alizadeh Behbahani[2], M. Noshad[3]

Received: 2022.04.19
Revised: 2022.05.08
Accepted: 2022.05.11
Available Online: 2022.05.15

How to cite this article:
Rahmati-Joneidabad, M., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2023). Investigation of chemical properties of green tea ethanolic extract and its inhibitory and lethal effects on *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* (causing rot in strawberry and grapes). *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *19*(4), 477-489. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.76184.1163

Introduction

Strawberry and grapes are generally infected with pathogenic fungi (e.g., *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifera*, etc.). Synthetic fungicides are commonly used as the first line of defense against post-harvest pathogens on packaging lines. However, disposal of toxic waste is a costly process and the hazardous waste causes serious environmental problems. In addition, fungal pathogens have shown a worrying trend of resistance to these fungicides, thus shortening the shelf life of products. Compounds that can be equally effective in controlling pathogens, but preventing or minimizing the waste problems will be inevitable. The large volume of internationally processed agricultural products, as well as the increasing demand for organically produced fruits, emphasizes the need to replace synthetic fungicides with safer and biodegradable alternatives. Natural plant-derived products effectively meet this criterion and have great potential to influence modern agricultural research. Catechins and other polyphenols in green tea show strong antioxidant activity. Also, the antimicrobial activity of green tea extract against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans* has been reported. Therefore, the present study was performed to prepare the ethanolic extract of green tea and to determine the content of total phenol, total flavonoids, antioxidant activity, and its antifungal effect against *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, and *Rhizopus stolonifer* (causing rot in strawberry and grapes).

Materials and Methods

Fresh green tea leaves were dried at room temperature and then powdered. Then, ethanol (70%) was added to the powdered leaves (solvent to powder ratio of 10:1 v/w) and the mixture was refluxed for 120 min. The resulting mixture was filtered through a filter paper and then concentrated under vacuum and finally dried in an oven.

Total phenol content (by Folin-Ciocalteu reagent at 756 nm), total flavonoid content (spectrophotometrically at 510 nm), antioxidant activity (by DPPH and ABTS radical scavenging methods), and antifungal effect (by disk diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration, and minimum fungicidal concentration) of the extract were evaluated.

1- Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
(*- Correspondinig Author Email: Rahmati@asnrukh.ac.ir)
2 and 3- Associate Professors, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
DOI: 10.22067/ifstrj.2022.76184.1163

Results and Discussion

The extract contained 175.60 mg GAE /g total phenol and 47.53 mg QE/g total flavonoids and its antioxidant activity using DPPH and ABTS free radical assays was 78.89% and 86.57%, respectively. The results of antifungal activity showed that the diameter of the growth inhibition zone increased significantly with increasing the concentration of the extract, and *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* were the most sensitive and resistant fungal strains to the extract, respectively. The minimum fungicidal concentrations for the strains of *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* were 64 and 512 mg/ml, respectively.

Conclusion

The results of the present study showed that the ethanolic extract of green tea could be considered as potential source of natural antioxidant and antifungal agents. The presence of phenolic and flavonoid compounds may be responsible for the antifungal and antioxidant effects of the extract. However, due to the fact that this study was performed with the crude extract of green tea, it is difficult to identify compounds responsible for antifungal and antioxidant activity. On this point, only the separation of the components of the extract allows the detection of antifungal and antioxidant compounds. This study provides a basis for further researches, in particular the use of these antioxidants and antifungal compounds. Green tea extract is especially suitable for products with high sensitivity to lipid oxidation and infection with molds.

Keywords: Antifungal activity, Antioxidant activity, Bioactive extract, Green tea, Natural preservative

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۲ ص. ۴۸۹-۴۷۷

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 3, Oct.-Nove. 2023, p. 477-489

مقاله پژوهشی

بررسی ویژگی‌های شیمیایی عصاره اتانولی چای سبز و اثر آن بر فعالیت مهارکنندگی و کشندگی *آسپرژیلوس نایجر*، *بوتریتیس سینه‌را* و *ریزوپوس استولونیفر* (عامل فساد میوه توت فرنگی و انگور)

مصطفی رحمتی جنیدآباد[1*]- بهروز علیزاده بهبهانی[2]- محمد نوشاد[3]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۳۰
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۲/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۱

چکیده

در طول چند دهه گذشته، استفاده از نگهدارنده های طبیعی و عصاره‌های گیاهی به دلیل نگرانی در مورد اثرات نامطلوب بهداشتی احتمالی ناشی از استفاده از نگهدارنده‌های مصنوعی مورد توجه قرار گرفته است. عصاره چای سبز، منبع طبیعی آنتی‌اکسیدان، نه تنها برای افزایش طعم، بلکه برای افزایش ماندگاری محصولات مختلف غذایی مورد استفاده قرار گرفته است. بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد قارچی عصاره چای سبز صورت پذیرفت. برای این منظور، عصاره چای سبز با کمک حلال اتانول استخراج گردید و محتوای فنول کل، فلاونوئید کل، اثر آنتی‌اکسیدانی (بر اساس روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS) و فعالیت ضد قارچی آن در برابر سویه‌های قارچی عامل فساد میوه توت‌فرنگی و انگور (*آسپرژیلوس نایجر*، *بوتریتیس سینه‌را* و *ریزوپوس استولونیفر*) مطابق روش‌های دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بررسی گردید. عصاره حاوی ۱۷۵/۶۰ mg GAE/g فنول کل و ۴۷/۵۳ mg QE/g فلاونوئید کل بود و فعالیت مهارکنندگی آن در برابر رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS به‌ترتیب ۷۸/۸۹ و ۸۶/۵۷ درصد بود. نتایج فعالیت ضد قارچی نشان داد که قطر هاله عدم رشد بطور معنی‌داری با افزایش غلظت عصاره افزایش می‌یابد و *بوتریتیس سینه‌را* و *ریزوپوس استولونیفر* به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌های قارچی نسبت به عصاره بودند. حداقل غلظت کشندگی برای سویه‌های *بوتریتیس سینه‌را* و *ریزوپوس استولونیفر* به‌ترتیب ۶۴ و ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره اتانولی چای سبز را می‌توان به منظور افزایش زمان ماندگاری محصولات غذایی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: چای سبز، عصاره زیست فعال، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضد قارچی، نگهدارنده طبیعی

مقدمه

توت‌فرنگی به دلیل فعالیت‌های بیولوژیکی عالی و مزایای بالقوه سلامتی، یک میوه محبوب و غذای کاربردی است و ارزش اقتصادی و تغذیه‌ای بالایی دارد (Tang *et al*., 2020). ایالات متحده آمریکا، چین، مکزیک، ترکیه و اسپانیا کشورهایی هستند که بیشترین تولید توت‌فرنگی را دارند (Baena *et al*., 2022). در ایران سالانه بیش از ۲۰۰۰۰ تن توت‌فرنگی تولید می‌شود. استان‌های کردستان و گلستان به‌ترتیب با ۲۰۰۰ و ۵۰۰ هکتار دو منطقه اصلی تولید هستند

۱- استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
۲ و ۳- دانشیاران، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: Rahmati@asnrukh.ac.ir)

DOI: 10.22067/ifstrj.2022.76184.1163

(Tehranifar and Sarsaefi, 2000). توسعه قارچ‌ها در طول حمل و نقل پس از برداشت و ذخیره‌سازی محصولات باغی می‌تواند خسارات اقتصادی زیادی ایجاد کند. از جمله این قارچ‌ها، *بوتریتیس سینه‌را* است که احتمالاً شایع‌ترین و گسترده‌ترین علت بیماری‌های میوه‌ها، سبزی‌ها و محصولات زراعی در سراسر جهان است. برخی از جدی‌ترین بیماری‌های ناشی از *بوتریتیس* شامل کپک خاکستری توت‌فرنگی است (Marquenie *et al.*, 2002).

انگور با تولید سالانه حدود ۶۷/۵ میلیون تن به عنوان یکی از بزرگ‌ترین محصولات میوه تولیدی جهان شناخته می‌شود و طبق گزارش فائو (۲۰۱۴)، ایران دهمین تولیدکننده انگور در جهان است. انگور با تولید سالانه ۲۰۵۶۸۹ تن در رتبه دوم محصولات باغی ایران قرار دارد (Mohseni *et al.*, 2018). انگور سرشار از مواد معدنی، ویتامین‌ها، کربوهیدرات‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها است. اگرچه انگور دارای فواید بسیار زیادی است، اما به دلایل مختلفی مانند تغییر رنگ ساقه، کاهش سفتی، خشک شدن، ریزش حبه، پوسیدگی قارچی و غیره، ماندگاری آن را کاهش داده است. در زنجیره بازاریابی انگور، پوسیدگی قارچی به عنوان عاملی بالقوه برای ایجاد خسارات اقتصادی هنگفت شناسایی شده است. تخمین زده شده است که ۱۰ تا ۴۰ درصد از کل تولید انگور به دلیل این پوسیدگی قارچی پس از برداشت از بین می‌رود. پوسیدگی قارچی عمدتاً به دلیل عفونت توسط قارچ‌های نهفته و ساکن یا عفونت میوه از طریق زخم‌ها در هنگام برداشت و حمل و نقل ایجاد می‌شود. مهم‌ترین قارچ‌های بیماری‌زا پس از برداشت گزارش شده از میوه انگور عبارت‌اند از *آسپرژیلوس کاربوناریوس*[1]، *آسپرژیلوس نایجر*[2]، *بوتریتیس سینه‌را*[3]، *پنی‌سیلیوم اکپانسوم*[4]، *ریزوپوس استولونیفر*[5]، *آلترناریا آلترناتا*[6] و غیره (Solairaj *et al.*, 2020).

قارچ‌کش‌های مصنوعی مانند ایمازالیل[7]، تیابندازول[8]، پیریمتانیل[9]، پروکلوراز[10] و گوازاتین[11] عموماً به عنوان اولین خط دفاعی در برابر پاتوژن‌های پس از برداشت روی خطوط بسته‌بندی استفاده می‌شوند. محلول‌های غوطه‌ور مانند ایمازالیل که در مخازن بزرگی با حجم حداقل ۱۵۰۰ لیتر تهیه می‌شوند، برای چند روز قبل از دفع باقی‌مانده نگهداری می‌شوند. دفع زباله‌های سمی فرایندی پرهزینه است و زباله‌های خطرناک مشکلات زیست‌محیطی جدی ایجاد می‌کند. علاوه بر این، پاتوژن‌های قارچی روند نگران‌کننده‌ای از مقاومت در برابر این قارچ‌کش‌ها را نشان داده‌اند و در نتیجه طول عمر محصولات را کوتاه می‌کند. ترکیباتی که می‌توانند کارایی برابری در کنترل پاتوژن داشته باشند، اما از مشکلات دفع جلوگیری کرده یا به حداقل برسانند، بسیار ارزشمند خواهند بود. حجم زیادی از محصولات کشاورزی که سالانه در سطح بین‌المللی تیمار می‌شوند، و همچنین افزایش تقاضا برای میوه‌های تولید شده ارگانیک، بر نیاز به جایگزینی قارچ‌کش‌های مصنوعی با جایگزین‌های ایمن‌تر و زیست‌تخریب‌پذیر تأکید دارد (du Plooy *et al.*, 2009).

محصولات طبیعی مشتق شده از گیاهان به طور مؤثر این معیار را برآورده می‌کنند و پتانسیل بسیار زیادی برای تأثیرگذاری بر پژوهش های کشاورزی مدرن دارند. استفاده از آفت‌کش‌های گیاهی در حال حاضر به عنوان یکی از ابزارهای اصلی برای محافظت از محصولات کشاورزی و فراورده‌های آن‌ها و محیط‌زیست در برابر آفت‌کش‌ها در حال ظهور است. مواد گیاهی سریع‌تر از اکثر آفت‌کش‌های شیمیایی تخریب می‌شوند و اکثر آفت‌کش‌های گیاهی معمولاً در عرض چند روز و گاهی حتی در عرض چند ساعت تجزیه می‌شوند (Al-Samarrai *et al.*, 2012). وجود ترکیبات فیتوشیمیایی مانند استروئید، تانن، فلاونوئید، آلکالوئید و ساپونین برای فعالیت ضد میکروبی در عصاره گیاهان گزارش شده است (Persaud *et al.*, 2019).

قدمت چای (*Camellia sinensis*) در چین به چندین هزار سال قبل باز می‌گردد. دو نوع عمده چای وجود دارد، چای سیاه و چای سبز، و هر دو حاوی کافئین (۱-۵ درصد) هستند و مقادیر کمی از آلکالوئیدهای گزانتین نیز وجود دارد. چای همچنین حاوی مقادیر زیادی تانن یا مواد فنولیک (۵ تا ۲۷ درصد) متشکل از کاتچین (فلاوانول) و واحدهای اسید گالیک است که در چای سبز بیشتر از چای سیاه است. به طور کلی، برگ‌های تازه چای سبز حاوی ۳۶ درصد پلی‌فنول هستند که در میان آن‌ها کاتچین‌ها غالب هستند. خواص دارویی چای در درجه اول به دلیل آلکالوئیدهای آن (کافئین) و کاتچین است که به چهار ترکیب اصلی اپی‌کاتچین، اپی‌کاتچین گالات، اپی‌گالوکاتچین، اپی‌گالوکاتچین گالات و چهار ترکیب ثانویه کاتچین، کاتچین گالات، گالوکاتچین و گالوکاتچین گالات تقسیم می‌شود. اپی‌گالوکاتچین گالات، کاتچین غالب موجود در برگ‌های چای سبز (۴۸ تا ۵۵ درصد از کل پلی‌فنول‌ها) است (Ho *et al.*, 1997; Perva-Uzunalić *et al.*, 2006). کاتچین‌ها و سایر پلی‌فنول‌های موجود در چای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی از خود نشان می‌دهند (Dufresne and

1- *Aspergillus carbonarius*
2- *Aspergillus niger*
3- *Botrytis cinerea*
4- *Penicillium expansum*
5- *Rhizopus stolonifer*
6- *Alternaria alternata*
7- Imazalil
8- Thiabendazole
9- Pyrimethanil
10- Prochloraz
11- Guazatine

Farnworth, 2001). علاوه بر این، چای سبز دارای خواص ضد پیری، ضد آلزایمر، ضد پارکینسون، ضد سکته و ضد سرطان می‌باشد (Namita *et al.*, 2012). همچنین، فعالیت ضدمیکروبی عصاره چای سبز در برابر باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و قارچ *کاندیدا آلبیکنس* گزارش شده است (Gupta and Kumar, 2017).

بنابراین، مطالعه حاضر به منظور استخراج عصاره اتانولی چای سبز و تعیین محتوای فنول کل، فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اثر ضدقارچی آن در برابر *آسپرژیلوس نایجر*، *بوتریتیس سینه‌را* و *ریزوپوس استولونیفر* (عوامل فساد میوه توت‌فرنگی و انگور) صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

مواد

۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)، ۲،۲-آزینو-بیس(۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید) (ABTS) کوئرستین و اسید گالیک از شرکت سیگما آلدریچ (آمریکا) خریداری شد. محیط‌های میکروبی شامل سابورود دکستروز آگار و سابورود دکستروز براث از شرکت مرک (آلمان) تهیه شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه دارای درجه آزمایشگاهی بودند.

استخراج عصاره چای سبز

از روش یانگ و همکاران (Yang *et al.*, 2009) با تغییرات مورد نیاز جهت استخراج عصاره برگ چای سبز استفاده گردید. برگ‌های تازه چای سبز در دمای اتاق خشک و سپس پودر شدند. در ادامه، حلال اتانول (۷۰ درصد) به پودر گیاه اضافه شد (نسبت حلال به پودر معادل ۱۰ به ۱ حجمی/وزنی) و مخلوط به مدت ۱۲۰ دقیقه رفلاکس گردید. مخلوط حاصل توسط کاغذ صافی فیلتر شد و سپس تحت خلأ تغلیظ و در نهایت توسط آون خشک گردید (Yang *et al.*, 2009).

فنول کل

محتوای فنول کل عصاره مطابق روش احمد و همکاران (Ahmed *et al.*, 2019) با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد. عصاره (۰/۲ میلی‌لیتر) با اسید گالیک (۰/۲ میلی‌لیتر؛ ۰-۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با ۲/۵ میلی‌لیتر معرف ۱۰ درصد فولین سیوکالتو مخلوط شد. سپس Na_2CO_3 (۲ میلی‌لیتر؛ ۷/۵ درصد) اضافه شد و محلول به مدت ۱ ساعت در دمای محیط نگهداری گردید. جذب محلول در ۷۵۶ نانومتر خوانده شد و میزان فنول کل عصاره محاسبه و به صورت میلی‌گرم معادل اسید گالیک (GAE) در هر گرم عصاره (mg GAE/g) بیان شد (Ahmed *et al.*, 2019).

فلاونوئید کل

محتوای فلاونوئید کل عصاره بر اساس روش ساکی و همکاران (Saki *et al.*, 2019) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، نمونه (۰/۵ میلی لیتر) با ۳۰۰ میکرولیتر محلول $NaNO_2$ (۲۰:۱ وزنی/حجمی) مخلوط، محلول حاصل به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در مرحله بعد، ۳۰۰ میکرولیتر محلول $AlCl_3$ (۱۰:۱ وزنی/حجمی)، ۲ میلی‌لیتر NaOH (۱ مولار) و آب مقطر (۱/۹ میلی‌لیتر) اضافه شد و به مدت ۱۰ ثانیه همزده شد. جذب محلول در ۵۱۰ نانومتر ثبت گردید و میزان فلاونوئید کل عصاره به صورت میلی‌گرم معادل کوئرستین (QE) در هر گرم از عصاره (mg QE/g) گزارش شد (Saki *et al.*, 2019).

مهار رادیکال آزاد DPPH

فعالیت مهار رادیکال DPPH مطابق روش یانگ و همکاران (Yang *et al.*, 2009) با اندکی اصلاح تعیین شد. در این روش، ۰/۸ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۰۱ مول در لیتر DPPH در متانول با ۲/۴ میلی‌لیتر از نمونه آزمایش محلول در متانول مخلوط شد. سپس مخلوط به شدت همزده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی نگهداری گردید. جذب محلول (OD_1) در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه شاهد حاوی همان مقدار متانول و رادیکال DPPH تهیه و در طول‌موج یکسان (OD_0) اندازه‌گیری شد. فعالیت مهار DPPH طبق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$Inhibition\ (\%) = [(OD_0-OD_1)/OD_1] \times 100$$

مهار رادیکال آزاد ABTS

روش نوشاد و همکاران (Noshad *et al.*, 2021) با تغییرات جزئی برای تعیین فعالیت مهار رادیکال ABTS عصاره استفاده شد. به طور خلاصه، حجم یکسان از محلول ۷ میلی‌مولار ABTS و ۲/۴۵ میلی‌مولار $K_2S_2O_8$ با هم مخلوط شده و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت در شرایط تاریک نگهداری شد. محلول کاتیونی رادیکال ABTS به دست آمده سپس با متانول رقیق شد تا به جذب ۰/۲ ± ۰/۷ در ۷۳۴ نانومتر برسد. پس از آن، عصاره (۰/۱ میلی‌لیتر) با محلول رادیکال ABTS (۳/۹ میلی‌لیتر) مخلوط شد و محلول به‌دست‌آمده به مدت ۶ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد و سپس جذب آن در ۷۳۴ نانومتر (OD_1) در برابر نمونه شاهد اندازه‌گیری شد (متانول؛ OD_0). فعالیت مهار ABTS طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$Inhibition\ (\%) = [(OD_0-OD_1)/OD_1] \times 100$$

فعالیت ضد قارچی

دیسک دیفیوژن آگار

غلظت‌های ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره توسط فیلتر سر سرنگی (۰/۲۲ میکرون) استریل شد. در ادامه، دیسک‌های بلانک به مدت ۲۰ دقیقه در عصاره اتانولی برگ چای سبز غوطه رو شدند. سپس سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند روی محیط کشت سابورود دکستروز آگار کشت داده شد. دیسک‌های بلانک آغشته به عصاره بر روی محیط کشت قرار داده شدند و پس از آن، محیط کشت حاوی سویه‌های میکروبی و عصاره در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. در نهایت قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری و بعنوان فعالیت ضد قارچی عصاره گزارش گردید (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2013a; Alizadeh Behbahani *et al.*, 2013b).

چاهک آگار

در این روش، چندین چاهک بر روی سطح محیط کشت سابورود دکستروز آگار از طریق یک پیپت پاستور استریل ایجاد شد. پس از آن، ۲۰ میکرولیتر عصاره با غلظت‌های مختلف (۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در چاهک‌ها ریخته شد. در مرحله بعد، پلیت‌هایی که قبلاً با گونه‌های قارچی آغشته شده بودند، بر اساس شرایط بیان شده برای روش دیسک دیفیوژن آگار گرمخانه‌گذاری شدند. اثر ضد قارچی عصاره برگ چای سبز از طریق اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک‌ها و برحسب میلی‌متر گزارش گردید (Alizade Behbahani *et al.*, 2014; Kiarsi *et al.*, 2020).

حداقل غلظت مهارکنندگی

برای این منظور، ابتدا غلظت‌های مختلف عصاره (۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶ و ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تهیه و سپس ۵ میلی‌لیتر از هر غلظت به ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی در لوله‌های آزمایش اضافه گردید. بعد از گرمخانه‌گذاری لوله‌های آزمایش به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد، رشد سویه‌های قارچی بصورت بصری و با مشاهده کدورت محیط بررسی شد. غلظتی از عصاره که سبب جلوگیری از رشد سویه‌ها (عدم ایجاد کدورت) در لوله آزمایش گردید به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی آن گزارش شد (Rahmati-Joneidabad *et al.*, 2021; Alizadeh Behbahani *et al.*, 2016a; Alizadeh Behbahani *et al.*, 2016b).

حداقل غلظت کشندگی

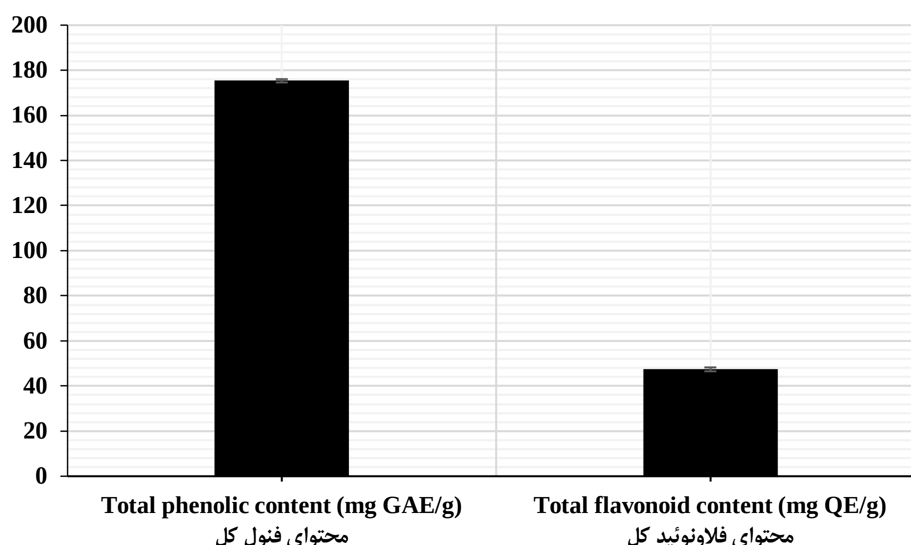
از لوله‌های آزمایش فاقد کدورت در آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره استفاده گردید. بطور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت درون لوله آزمایش برداشته و روی سطح محیط کشت سابروز دکستروز آگار کشت داده شد. در ادامه، محیط کشت به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس غلظتی از عصاره که سبب جلوگیری از رشد سویه‌های قارچی شد، به عنوان حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی برگ چای سبز گزارش گردید (Rahmati-Joneidabad and Alizadeh Behbahani, 2021; Alghooneh *et al.*, 2015; Yeganegi *et al.*, 2018).

آنالیز آماری

آزمون‌های این مطالعه در سه نوبت تکرار گردید. داده‌های حاصل بر پایه آنالیز واریانس یک‌طرفه با کمک نرم‌افزار SPSS آنالیز شدند. آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($p<0.05$) جهت تعیین اختلاف بین میانگین نتایج استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج بررسی میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره اتانولی برگ چای سبز نشان داد که عصاره غنی از ترکیبات فنولی (۱۷۵/۶۰ ± ۰/۴۶ mg GAE/g) و فلاونوئیدی (۴۷/۵۳ ± ۰/۷۳ mg QE/g) است (شکل ۱). در راستای این پژوهش، Xi و همکاران (۲۰۱۲)، میزان فنول کل عصاره آبی چای سبز را ۳/۷ g GAE/l – ۵/۱۵ گزارش نمودند (Xi *et al.*, 2012). در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردید که عصاره چای سبز دارای ۲۰۸۳ mg GAE/l محتوای فنول کل می‌باشد (Almajano *et al.*, 2008). علاوه بر این، میزان فنول کل معادل ۱۷۳/۱۶ mg GAE/g در عصاره اتانولی چای سبز توسط سایر محققین گزارش شده است (Bharti and Singh, 2020). فلاونوئیدهای موجود در چای فلاوانول‌ها و فلاونول‌ها هستند. کاتچین‌های چای از نظر ساختاری عمدتاً فلاوانول هستند و ۲۰ تا ۳۰ درصد وزن خشک چای سبز را تشکیل می‌دهند. کاتچین‌های اصلی در برگ‌های تازه چای و چای سبز عبارت‌اند از اپی‌گالوکاتچین گالات، اپی‌گالوکاتچین، اپی‌کاتچین گالات و اپی‌کاتچین. فلاونول‌های اصلی موجود در برگ چای کوئرستین، کامپفرول و میریستین هستند (Wang *et al.*, 2000). با این حال، میزان ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌های گیاهی به شرایط استخراج و حلال مورد استفاده برای استخراج نیز بستگی دارد (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2021; Ebrahimi Hemmati Kaykha *et al.*, 2020). از آنجایی که عصاره چای سبز منبع قابل‌توجهی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است، می‌توان آن را برای افزایش پایداری اکسایشی محصولات غذایی مختلف در نظر گرفت.

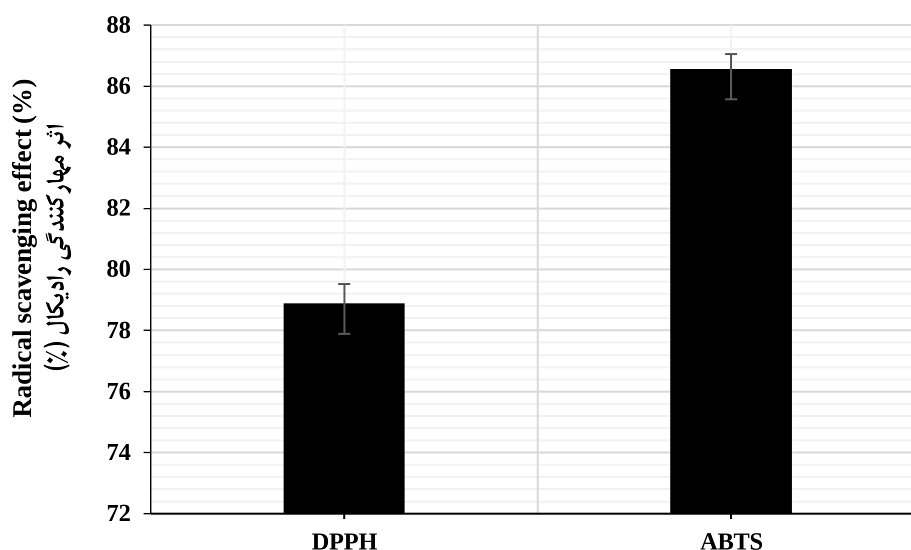


شکل ۱- محتوای فنول و فلاونوئید کل عصاره اتانولی برگ چای سبز

Fig. 1- Total phenol and flavonoid contents of green tea ethanolic extract

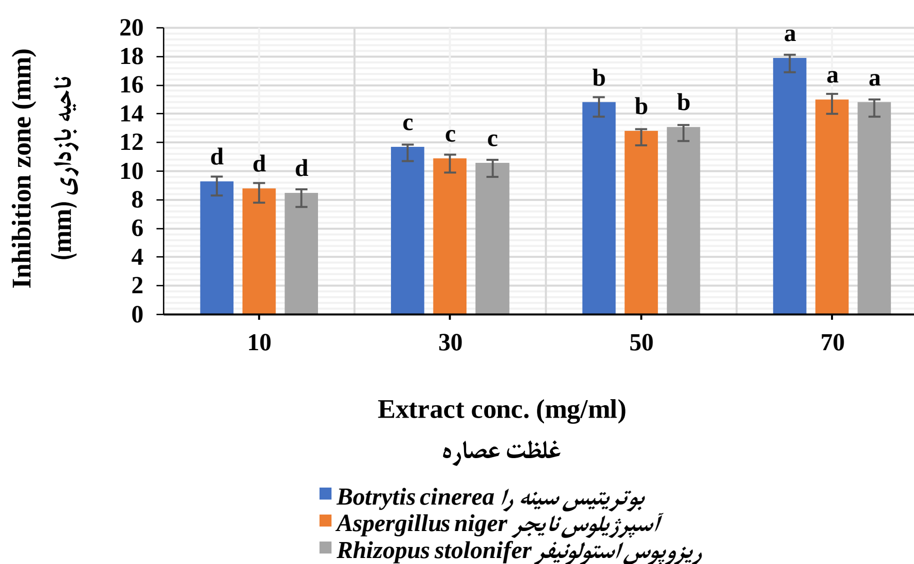
شکل ۲، نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی برگ چای سبز را نشان می‌دهد. عصاره بطور مؤثری قادر به مهار رادیکال آزاد DPPH (۰/۶۳ ± ۷۸/۸۹ درصد) و ABTS (۰/۴۸ ± ۸۶/۵۷ درصد) بود. یکی از مکانیسم‌های اثر آنتی‌اکسیدانی (که اعتقاد بر این است که در فعالیت کاتچین‌های چای مهم است) مهار رادیکال‌های آزاد و در نتیجه مهار اکسیداسیون است. این مکانیسم همچنین توضیحی برای فعالیت ضد میکروبی در سلول‌ها و غشاء سلولی است (Frei and Higdon, 2003). اثر آنتی‌اکسیدانی بستگی به واریته چای دارد و محتوای اپی‌گالوکاتچین گالات بسیار مهم است. چای سبز دارای سطوح بالایی از اپی‌گالوکاتچین گالات و اپی‌گالوکاتچین هستند، اما محتوای چای سیاه بسیار کمتر است (Katalinic *et al*., 2006). توانایی آنتی‌اکسیدانی کاتچین‌ها، ارزیابی شده با روش DPPH، به این صورت گزارش شده است: اپی‌گالوکاتچین گالات > اپی‌کاتچین گالات > اپی‌گالوکاتچین > اپی‌کاتچین > کاتچین (Katalinic *et al*., 2006; Łuczaj and Skrzydlewska, 2005). فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنول‌های چای سبز در درجه اول به ترکیب حلقه‌های آروماتیک و گروه‌های هیدروکسیل ساختار شیمیایی نسبت داده می‌شود که رادیکال‌های آزاد لیپیدی را مهار و خنثی می‌کنند. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که پلی‌فنول‌ها و کاتچین‌های چای اهداء کنندگان استثنایی الکترون و جاذب‌های مؤثر گونه‌های اکسیژن فعال فیزیولوژیکی مرتبط در شرایط آزمایشگاهی هستند (Camargo *et al*., 2016; Sabaghi *et al*., 2015; Senanayake, 2013).

نتایج فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی چای سبز بر اساس روش دیسک دیفیوژن آگار در شکل ۳ ارائه شده است. رشد تمامی سویه‌های قارچی در حضور عصاره چای سبز بطور مؤثری متوقف گردید. افزایش غلظت عصاره از ۱۰ به ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سبب افزایش قطر هاله عدم رشد از ۸/۸۷ میلی‌متر به ۱۵/۹ میلی‌متر گردید ($p<0/05$). علاوه بر این، سویه‌های *بوتریتیس سینه‌را* و *ریزوپوس استولونیفر* به ترتیب با بالاترین و کمترین قطر هاله عدم رشد، حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه‌های قارچی نسبت به عصاره بودند.



شکل ۲- فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی برگ چای سبز

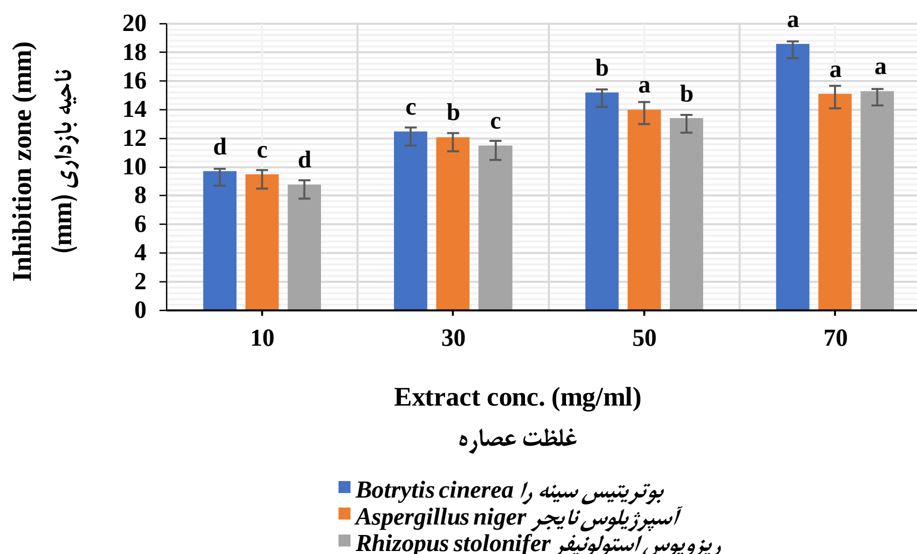
Fig. 2- Antioxidant activity of green tea ethanolic extract



شکل ۳- فعالیت ضد قارچی عصاره اتانولی برگ چای سبز بر پایه روش دیسک دیفیوژن آگار

Fig. 3- Antifungal activity of green tea ethanolic extract, based on disk diffusion agar method

شکل ۴، اثر ضد قارچی عصاره چای سبز بر پایه روش چاهک آگار را نشان می‌دهد. بطور مشابه، افزایش غلظت عصاره (۱۰ به ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) سبب افزایش معنی‌دار قطر هاله عدم رشد (۹/۷۳ به ۱۶/۳۳ میلی‌متر) گردید. بطور کلی، *بوتریتیس سینه‌را* حساس‌ترین و *ریزوپوس استولونیفر* مقاوم‌ترین سویه‌های قارچی در برابر عصاره اتانولی برگ چای سبز بودند. علاوه بر این، نتایج قطر هاله عدم رشد در روش چاهک آگار بزرگ‌تر از روش دیسک دیفیوژن آگار بودند. بطوریکه در غلظت ۷۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره، قطر هاله عدم رشد در آزمون چاهک آگار حدود ۶/۵ درصد بزرگ‌تر از قطر هاله عدم رشد در آزمون دیسک دیفیوژن آگار بود. این حالت عمدتاً ناشی از این حقیقت است که عصاره در این روش در تماس مستقیم با میکروارگانیسم‌ها است، درحالی‌که عصاره در روش دیسک دیفیوژن آگار بایستی از سطوح دیسک به محیط پخش شود تا اثر ضدمیکروبی خود را نشان دهد (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2021; Alizadeh Behbahani *et al.*, 2019; Barzegar *et al.*, 2020; Hojjati and Alizadeh Behbahani, 2021).



شکل ٤- فعالیت ضد قارچی عصاره اتانولی برگ چای سبز بر پایه روش چاهک آگار

Fig. 4- Antifungal activity of green tea ethanolic extract, based on well diffusion agar method

جدول ۱- نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) عصاره اتانولی چای سبز به روش ماکرودایلوشن براث بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

Table 1- The results of minimum inhibitory concentration (MIC) of green tea ethanolic extract on microorganisms tested, based on microdilution broth method

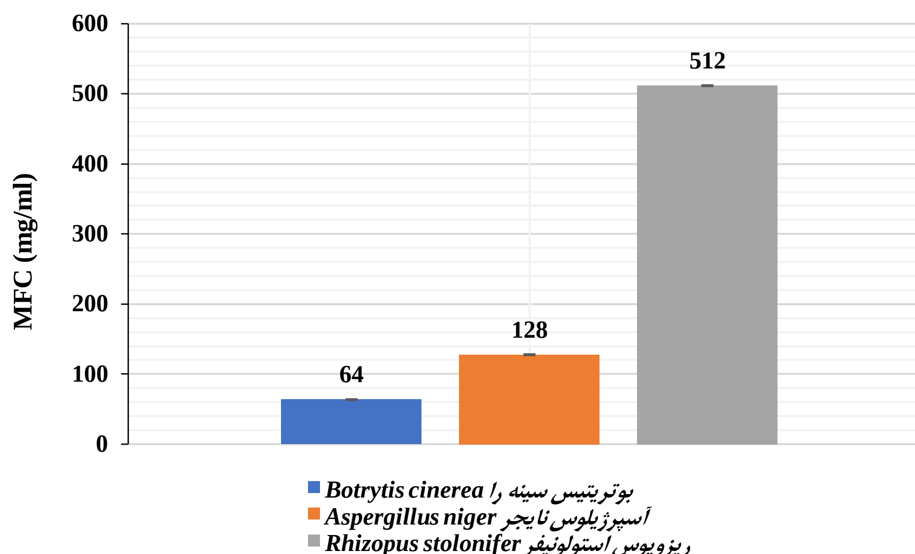
Microorganism میکروارگانیسم	Extract concentration (mg/ml) غلظت عصاره								
	4	8	16	32	64	128	256	512	Control
Botrytis cinerea *بوتریتیس سینه‌را*	+	–	–	–	–	–	–	–	–
Aspergillus niger *آسپرژیلوس نایجر*	+	–	–	–	–	–	–	–	–
Rhizopus stolonifera *ریزوپوس استولونیفر*	+	+	+	+	+	–	–	–	–

+: Grown; -: Not grown

نتایج آزمون ضدمیکروبی عصاره اتانولی چای سبز در برابر سویه‌های قارچی بر اساس روش حداقل غلظت مهارکنندگی رشد در جدول ۱ گزارش شده است. مطابق نتایج، غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره تأثیری بر رشد سویه‌های قارچی نشان نداد، اما افزایش غلظت عصاره سبب جلوگیری از رشد سویه‌های قارچی گردید. بطوریکه به استثناء رشد *ریزوپوس استولونیفر* در حضور غلظت‌های ۴-۶۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، تمامی سویه‌های قارچی در حضور غلظت‌های بالای عصاره قادر به رشد نبودند.

نتایج آزمون حداقل غلظت کشندگی در راستای یافته‌های سایر آزمون‌های ضدمیکروبی بود (شکل ۵). قارچ *ریزوپوس استولونیفر* با حداقل غلظت کشندگی ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و *بوتریتیس سینه‌را* با حداقل غلظت کشندگی ۶۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب مقاوم‌ترین و حساس‌ترین سویه‌های قارچی نسبت به عصاره اتانولی برگ چای سبز بودند.

ایکسی و همکاران (Xi *et al.*, 2012) نشان دادند که عصاره آبی چای سبز می‌تواند جمعیت پنج سویه از *ویبریو پاراهمولیتیکوس* را از 10^4 CFU/ml به سطوح غیر قابل تشخیص (< ۱ log CFU/ml) کاهش دهد و نتایج این محققین نشان داد که اثر ضدمیکروبی به میزان فنول کل در عصاره چای بستگی دارد (Xi *et al.*, 2012). مطالعات متعددی گزارش کرده‌اند که اپی‌گالوکاتچین گالات ترکیبی است که عمدتاً به فعالیت ضد میکروبی کمک می‌کند (Almajano *et al.*, 2008; Chou *et al.*, 1999; Si *et al.*, 2006; Taguri *et al.*, 2004).



شکل ۵- فعالیت ضد قارچی عصاره اتانولی برگ چای سبز بر پایه روش حداقل کشندگی

Fig. 5- Antifungal activity of green tea ethanolic extract, based on minimum fungicidal concentration method

استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به عنوان نگهدارنده در غذا پتانسیل بالایی دارد زیرا مصرف‌کنندگان مواد غذایی بدون افزودنی، تازه‌تر و طعم طبیعی‌تر را درخواست می‌کنند. با این حال، حفظ ایمنی میکروبیولوژیکی و به حداقل رساندن تعداد میکروارگانیسم‌های ناشی از مواد غذایی ضروری است. در این رابطه، مطالعاتی وجود دارد که نشان می‌دهد عصاره چای به‌عنوان مهارکننده عوامل بیماری‌زای غذایی از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس، شیگلا دیسانتری، ویبریو کلرا، کمپیلوباکتر ژژونی، لیستریا مونوسیتوژنز* و غیره عمل می‌کند (Negi *et al.*, 2003; Taguri *et al.*, 2004). با این حال، تمام کاتچین‌های عصاره چای دارای فعالیت ضد باکتریایی نیستند. برخی از محققین دریافته‌اند که عصاره چای سبز در برابر *اشریشیا کلی* مؤثر نیست، اگرچه که اپی‌گالوکاتچین گالات در غلظت ۱۰۰-۱۰ میکرومولار رشد *اشریشیا کلی* را تقریباً ۵۰ درصد کاهش می‌دهد (Nazer *et al.*, 2005). در مطالعه‌ای دیگر مشخص گردید که بیشترین فعالیت ضد میکروبی مربوط به بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کمتر به محتوای پلی‌فنول کل است. به همین دلیل می‌توان ادعا کرد که همه پلی‌فنول‌های چای دارای اثرات ضد میکروبی نیستند (Almajano *et al.*, 2008). در این راستا، گزارش شده است که اپی‌گالوکاتچین گالات و اپی‌گالوکاتچین دارای بالاترین قدرت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی هستند (Gramza and Korczak, 2005). فعالیت ضد میکروبی/قارچی عصاره چای سبز با محتوای کاتچین مرتبط است و گزارش شده است که بخش‌های هیدروکسیل در موقعیت '۳، '۴ و '۵ روی حلقه B در مولکول‌های کاتچین، عوامل اصلی فعالیت ضد میکروبی/قارچی عصاره چای سبز هستند (Koech *et al.*, 2013; Sabaghi *et al.*, 2015).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره اتانولی چای سبز ممکن است منبع بالقوه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و عوامل ضد قارچی باشد. وجود ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی ممکن است مسئول اثر ضد قارچی عصاره باشد. با این حال، با توجه به اینکه مطالعات با عصاره خام انجام شده است، شناسایی ترکیبات مسئول فعالیت ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی دشوار است. در این مورد، تنها جداسازی اجزای تشکیل دهنده عصاره، امکان آشکارسازی ترکیب ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی را فراهم می‌کند. نتایج حاضر مبنایی برای تحقیقات بیشتر، به ویژه استفاده از این آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات ضد قارچی فراهم می‌کند. عصاره چای سبز به ویژه برای محصولات با حساسیت بالا نسبت به اکسیداسیون لیپیدی و کپک‌زدگی مناسب است.

سپاسگزاری

مقاله حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۱۴۰۰/۳۱ می‌باشد، لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. Ahmed, A.F., Attia, F.A., Liu, Z., Li, C., Wei, J., & Kang, W. (2019). Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. *Food Science and Human Wellness*, *8*(3), 299-305. https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.07.004
2. Alghooneh, A., Alizadeh Behbahani, B., Noorbakhsh, H., & Tabatabaei Yazdi, F. (2015). Application of intelligent modeling to predict the population dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* in Frankfurter sausage containing Satureja bachtiarica extracts. *Microbial Pathogenesis*, *85*, 58-65. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.06.003
3. Alizade Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F,. Heidari Sureshjani, M., Mortazavi, A., & Tabatabaei Yazdi, F. (2014). Antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic *Satureja bachtiarica* extracts “in vitro”. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine*, *19*(64), 13-19.
4. Alizadeh Behbahani, B., Falah, F., Vasiee, A., & Tabatabaee Yazdi, F. (2021). Control of microbial growth and lipid oxidation in beef using a *Lepidium perfoliatum* seed mucilage edible coating incorporated with chicory essential oil. *Food Science & Nutrition*, *9*(5), 2458-2467. https://doi.org/10.1002/fsn3.2186
5. Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Falah, F. (2019). Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of *Syzygium aromaticum* essential oil on foodborne pathogens. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, *13*(1), 875-883.
6. Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Yazdi, F.T., & Mohebbi, M. (2013a). Antifungal effect of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on pathogenic fungus" in vitro". *International Journal of Agronomy and Plant Production*, *4*(7), 1652-1658.
7. Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, S.A., Zendeboodi, F., Gholian, M.M., & Vasiee, A. (2013b). Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* L. on food infection and intoxication microorganisms “in vitro”. *Journal of Paramedical Sciences*, *4(3)*, 89-99.
8. Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Noorbakhsh, H., Riazi, F., Jajarmi, A., & Tabatabaei Yazdi, F. (2016b). Study of the antibacterial activity of methanolic and aqueous extracts of *Myrtus communis* on pathogenic strains causing infection. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, *18*(2), e5989.
9. Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F., & Riazi, F. (2016a). Antifungal effect of the aqueous and ethanolic *Avicennia marina* extracts on *Alternaria citri* and *Penicillium digitatum*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, *18*(2), e5992.
10. Almajano, M.P., Carbo, R., Jiménez, J.A.L., & Gordon, M.H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, *108*(1), 55-63. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.040
11. Al-Samarrai, G., Singh, H., & Syarhabil, M. (2012). Evaluating eco-friendly botanicals (natural plant extracts) as alternatives to synthetic fungicides. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *19*(4), 673-676.
12. Baena, R., Araujo, E.S., Souza, J.P., Bischoff, A.M., Zarbin, P.H., Zawadneak, M.A., & Cuquel, F.L. (2022). Ripening stages and volatile compounds present in strawberry fruits are involved in the oviposition choice of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Crop Protection*, *153*, 105883. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105883
13. Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M.A. (2020). Quality retention and shelf life extension of fresh beef using *Lepidium sativum* seed mucilage-based edible coating containing *Heracleum lasiopetalum* essential oil: an experimental and modeling study. *Food Science and Biotechnology*, *29*(5), 717-728. https://doi.org/10.1007/s10068-019-00715-4
14. Bharti, R., & Singh, B. (2020). Green tea (*Camellia assamica*) extract as an antioxidant additive to enhance the oxidation stability of biodiesel synthesized from waste cooking oil. *Fuel*, *262*, 1, 16658. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116658
15. Camargo, L., Pedroso, L., Vendrame, S., Mainardes, R., & Khalil, N. (2016). Antioxidant and antifungal activities of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze leaves obtained by different forms of production. *Brazilian Journal of Biology*, *76*, 428-434.
16. Chou ,C.-C., Lin, L.-L., & Chung, K.-T. (1999). Antimicrobial activity of tea as affected by the degree of fermentation and manufacturing season. *International Journal of Food Microbiology*, *48*(2), 125-130. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00034-3
17. du Plooy, W., Regnier, T., & Combrinck, S. (2009). Essential oil amended coatings as alternatives to synthetic fungicides in citrus postharvest management. *Postharvest Biology and Technology*, *53*(3), 117-122. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.04.005
18. Dufresne, C.J., & Farnworth, E.R. (2001). A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *12*(7), 404-421. https://doi.org/10.1016/S0955-2863(01)00155-3

19. Ebrahimi Hemmati Kaykha, M., Jooyandeh, H., Alizadeh behbahani, B., & Noshad, M. (2020). Antimicrobial potential of *Cordia myxa* fruit on pathogenic bacteria: A study “in vitro” laboratory conditions. *Food Science and Technology*, *17*(101), 71-80.
20. Frei, B., & Higdon, J.V. (2003). Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *The Journal of nutrition*, *133*(10), 3275S-3284S. https://doi.org/10.1093/jn/133.10.3275S
21. Gramza, A., & Korczak, J. (2005). Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Science & Technology*, *16*(8), 351-358. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.02.004
22. Gupta, D., & Kumar, M. (2017). Evaluation of in vitro antimicrobial potential and GC–MS analysis of *Camellia sinensis* and *Terminalia arjuna*. *Biotechnology Reports*, *13*, 19-25. https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.11.002
23. Ho, C., Chen, C., Wanasundara, U., & Shahidi, F. (1997). Natural antioxidants from tea. *Natural Antioxidants*, 213-223.
24. Hojjati, M., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). Evaluation of the effect of aqueous and methanolic extraction methods on the antioxidant and antimicrobial characteristics of *Allium jesdianum* extract: in vitro study. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *17*(1), 83-91. https://doi.org/10.22067/ifstrj.v17i1.85992
25. Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., & Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, *94*(4), 550-557. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.004
26. Kiarsi, Z., Hojjati, M., Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2020). In vitro antimicrobial effects of *Myristica fragrans* essential oil on foodborne pathogens and its influence on beef quality during refrigerated storage. *Journal of Food Safety*, *40(3)*, e12782. https://doi.org/10.1111/jfs.12782
27. Koech, K., Wachira, F.N., Ngure, R., Orina, I., Wanyoko, J., Bii, C., & Karori, S. (2013). Antifungal activity of crude tea extracts. *African Journal of Agricultural Research*, *8*(19), 2086-2089.
28. Łuczaj, W., & Skrzydlewska, E. (2005). Antioxidative properties of black tea. *Preventive Medicine*, *40*(6), 910-918. https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2004.10.014
29. Marquenie, D., Michiels, C., Geeraerd, A., Schenk, A., Soontjens, C., Van Impe, J., & Nicolaı, B. (2002). Using survival analysis to investigate the effect of UV-C and heat treatment on storage rot of strawberry and sweet cherry. *International Journal of Food Microbiology*, *73*(2-3), 187-196. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00648-1
30. Mohseni, P., Borghei, A.M., & Khanali, M. (2018). Coupled life cycle assessment and data envelopment analysis for mitigation of environmental impacts and enhancement of energy efficiency in grape production. *Journal of Cleaner Production*, *197*, 937-947. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.06.243
31. Namita, P., Mukesh, R., & Vijay, K.J. (2012). *Camellia sinensis* (green tea): a review. *Global Journal of Pharmacology*, *6*(2), 52-59.
32. Nazer, A., Kobilinsky, A., Tholozan, J.-L., & Dubois-Brissonnet, F. (2005). Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? *Food Microbiology*, *22*(5), 391-398. https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.10.003
33. Negi, P., Jayaprakasha, G., & Jena, B. (2003). Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, *80*(3), 393-397. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00279-0
34. Noshad, M., Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Rahmati-Joneidabad, M., Hemmati Kaykha, M.E., & Ghodsi Sheikhjan, M. (2021). Utilization of *Plantago major* seed mucilage containing *Citrus limon* essential oil as an edible coating to improve shelf-life of buffalo meat under refrigeration conditions. *Food Science & Nutrition*, *9*(3), 1625-1639. https://doi.org/10.1002/fsn3.2137
35. Persaud, R., Khan, A., Isaac, W.-A., Ganpat, W., & Saravanakumar, D. (2019). Plant extracts, bioagents and new generation fungicides in the control of rice sheath blight in Guyana. *Crop Protection*, *119*, 30-37. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.01.008
36. Perva-Uzunalić, A., Škerget, M., Knez, Ž., Weinreich, B., Otto, F., & Grüner, S. (2006). Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry*, *96*(4), 597-605. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.015
37. Rahmati-Joneidabad, M., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). Identification of chemical compounds, antioxidant potential, and antifungal activity of *Thymus daenensis* essential oil against spoilage fungi causing apple rot. *Iranian Food Science and Technology Research*, *17*(5), 691-700. https://doi.org/10.22067/ifstrj.v18i1.87595
38. Rahmati-Joneidabad, M., Alizade Behbahani, B., & Noshad, M. (2021). Antifungal effect of *Satureja khuzestanica* essential oil on *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, and *Rhizopus stolonifer* causing strawberry’s rot and mold. *Food Science and Technology*, *18*(115), 171-180. https://doi.org/10.52547/fsct.18.115.13
39. Sabaghi, M., Maghsoudlou, Y., Khomeiri, M., & Ziaiifar, A.M. (2015). Active edible coating from chitosan incorporating green tea extract as an antioxidant and antifungal on fresh walnut kernel. *Postharvest Biology and Technology*, *110*, 224-228. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.08.025

40. Saki, A., Mozafari, H., Asl, K. K., Sani, B., & Mirza, M. (2019). Plant yield, antioxidant capacity and essential oil quality of *Satureja mutica* supplied with cattle manure and wheat straw in different plant densities. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *50*(21), 2683-2693. https://doi.org/10.1080/00103624.2019.1670835
41. Senanayake, S.N. (2013). Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications–A review. *Journal of Functional Foods*, *5*(4), 1529-1541. https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.011
42. Si, W., Gong, J., Tsao, R., Kalab, M., Yang, R., & Yin, Y. (2006). Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *Journal of Chromatography A*, *1125*(2), 204-210 . https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.061
43. Solairaj, D., Legrand, N.N.G., Yang, Q., & Zhang, H. (2020). Isolation of pathogenic fungi causing postharvest decay in table grapes and in vivo biocontrol activity of selected yeasts against them. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *110*, 101478. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101478
44. Taguri, T., Tanaka, T., & Kouno, I. (2004). Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *27*(12), 1965-1969.
45. Tang, Y., Ma, X., Li, M., & Wang, Y. (2020). The effect of temperature and light on strawberry production in a solar greenhouse. *Solar Energy*, *195*, 318-328. https://doi.org/10.1016/j.solener.2019.11.070
46. Tehranifar, A., & Sarsaefi, M. (2000). *Strawberry growing in Iran*. IV International Strawberry Symposium 567.
47. Wang, H., Provan, G.J., & Helliwell, K. (2000). Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. *Trends in Food Science & Technology*, *11*(4-5), 152-160. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00061-3
48. Xi, D., Liu, C., & Su, Y.-C. (2012). Effects of green tea extract on reducing *Vibrio parahaemolyticus* and increasing shelf life of oyster meats. *Food Control*, *25*(1), 368-373. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.002
49. Yang, Z., Tu, Y., Baldermann, S., Dong, F., Xu, Y., & Watanabe, N. (2009). Isolation and identification of compounds from the ethanolic extract of flowers of the tea (*Camellia sinensis*) plant and their contribution to the antioxidant capacity. *LWT - Food Science and Technology*, *42*(8), 1439-1443. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.03.017
50. Yeganegi, M., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, S.A., Asili, J., Alizadeh Behbahani, B., & Beigbabaei, A. (2018). *Equisetum telmateia* extracts: Chemical compositions, antioxidant activity and antimicrobial effect on the growth of some pathogenic strain causing poisoning and infection. *Microbial Pathogenesis*, *116*, 62-67. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.014